

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 1 月 8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/003130 A1(51) 国際特許分類⁷: C12M 1/00, C12N
11/02, 5/06, A61L 27/00, D01F 8/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008080

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 26 日 (26.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-190674 2002 年 6 月 28 日 (28.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社生物有機化学研究所 (CHEMICAL BIOLOGY INSTITUTE) [JP/JP]; 〒004-0814 北海道 札幌市 清田区 美しが丘四条 9 丁目 2 番 1 号 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 眞島 任史 (MAJIMA, Tokifumi) [JP/JP]; 〒064-0921 北海道 札幌市 中央区南二十一条西 1 丁目 3-1 1-201 Hokkaido (JP). 岩崎 倫政 (IWASAKI, Norimasa) [JP/JP]; 〒060-0003 北海道 札幌市 中央区北三条西 1 丁目 1-2 1 2-2-803 Hokkaido (JP). 船越 忠直 (FUNAKOSHI, Tadanao) [JP/JP]; 〒065-0023 北海道 札幌市 東区北二十三条東 9 丁目 1-1 9 Hokkaido (JP). 三浪 明男 (MINAMI, Akio) [JP/JP]; 〒064-0959 北

海道 札幌市 中央区宮ヶ丘 2 丁目 1-3 0-1 0 0 3 Hokkaido (JP). 西村 紳一郎 (NISHIMURA, Shin-ichiro) [JP/JP]; 〒060-0009 北海道 札幌市 中央区北九条西 1 6 丁目 1-1-3 0 2 Hokkaido (JP). 戸倉 清一 (TOKURA, Seichi) [JP/JP]; 〒564-0041 大阪府 吹田市 泉町 5-1 3-1 6-1 0 3 Osaka (JP). 原田 和夫 (HARADA, Kazuo) [JP/JP]; 〒004-0003 北海道 札幌市 厚別区厚別東三条 7 丁目 3-2 7 Hokkaido (JP). 野中 佐智子 (NONAKA, Sachiko) [JP/JP]; 〒062-0907 北海道 札幌市 豊平区豊平七条 7 丁目 1-2 0 Hokkaido (JP). 前川 直彦 (MAEKAWA, Nobuhiko) [JP/JP]; 〒004-0813 北海道 札幌市 清田区美しが丘三条 6 丁目 1-1-3 0 5 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHITOSAN/ACIDIC BIOPOLYMER HYBRID FIBER AND CULTURE BASE FOR ANIMAL CELLS

(54) 発明の名称: キトサンと酸性生体高分子とのハイブリッド繊維および動物細胞培養基材

(57) Abstract: It is intended to provide a three-dimensional base appropriate for culturing animal cells such as cartilage cells or fibroblasts. This three-dimensional base, which comprises a chitosan/acidic biopolymer hybrid fiber composed of chitosan or its salt as the inside of the fiber and a complex of chitosan with a bioabsorbable acidic biopolymer coating the fiber surface, is made of a fiber capable of retaining its shape after allowing to stand in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% of FBS (fetal bovine serum) at room temperature for 2 weeks.

(57) 要約: 本発明は、動物細胞、例えば軟骨細胞または線維芽細胞の培養に適した 3 次元基材を提供する。該 3 次元基材は、繊維内部がキトサンまたはその塩よりなり、繊維表面がキトサンと生体吸収性の酸性生体高分子との複合体で被覆されているキトサン/酸性生体高分子ハイブリッド繊維であって、10% FBS (ウシ胎仔血清) を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地中に、室温で 2 週間置いても形態を保持する繊維より製造される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/003130 A1

明 細 書

キトサンと酸性生体高分子とのハイブリッド繊維および動物細胞培養基材

5 技術分野

本発明は、キトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維、および該ハイブリッド繊維の製造方法に関する。本発明はさらに、該ハイブリッド繊維よりなる動物細胞培養用３次元基材、並びに該基材を用いる動物細胞培養方法にも関する。

10 背景技術

高齢化社会を迎え、関節症患者は人口の１％にも達しようとしている。これらの疾患者の大部分は軟骨組織が損傷を受けたり壊死することによって起こる変形性関節症や慢性リウマチによるものと言われている。軟骨は自己再生能が極めて低いことから、外科的治療が必要な場合には人工関節置換術が施されている。しかし、この方法では装着物からの金属イオンの溶出による炎症や骨接合部との緩み、耐久性等に大きな課題があり、医療用具としての寿命は１０年程度とされていることから、人工関節手術は根治的な治療法にはなっていない。

また事故やスポーツによる靱帯（特に膝の関節を固定している膝前十字靱帯）や腱の損傷の治療では、自己の正常な靱帯あるいは腱の一部を移植する再建術が行われているが、この治療法では移植に使用した正常部位の筋力が半分程度に低下してしまい、運動機能に支障を生じることが大きな問題となっている。人工の合成繊維から成る人工靱帯を移植する手術も従来から検討されてきたが、細胞が付着しないために人工物が時間の経過とともに擦り切れてしまうという問題があり、現在は殆ど使用されていない状況にある。

そこで、近年、自己再生能の低い組織を対象に、正常部位の自己組織を一度体外に取り出し、培養して増殖・分化させた後、再び体内に移植して目的組織の再生を図ろうとする再生医療の研究が盛んに行われている。細胞はある物質の表面に接着することによって増殖・分化が起こることから、再生医療の発展には培養細胞が接着するための足場となる良好な人工基材（以下、基材と呼ぶ）の開発が

不可欠とされている。

一般に、組織再生用の基材に求められる条件として、① 炎症反応が見られず、生体親和性に優れていること、② 生体吸収性であること、③ 細胞の接着性がよいこと、④ 細胞の活性を維持できること、⑤ 細胞の増殖・分化による組織再生が可能な3次元構造を有することが挙げられる。さらに、股関節部位の軟骨には20Mpa程度までの圧縮応力がかかり、靱帯や腱には大きい引張り応力がかかる。このことから、軟骨組織再生用または靱帯や腱の再生用基材には上記5つの条件以外に、⑥ 体内で組織が再生されるまでの形状の安定性が確保されること、および⑦ 機械的強度を有することの2つの条件も満たす基材の開発が必要と考えられる。

再生医療の観点から線維芽細胞や平滑筋細胞、内皮細胞等の間質細胞を生体吸収性材料（ポリグリコール酸、綿、腸線縫合糸、セルロース、ゼラチン、コラーゲン、ポリヒドロキシアルカノエート）または非生体吸収性材料（ポリアミド化合物、ポリエステル化合物、ポリスチレン化合物、ポリプロピレン化合物、ポリアクリレート化合物、ポリビニル化合物、ポリカーボネート化合物、ポリテトラフルオロエチレン化合物、ニトロセルロース化合物）から成る3次元支持体（フレームワーク）に埋め込んで培養し、間質細胞と間質細胞が自然に分泌する結合組織タンパク質によって架橋される3次元構造物を包んだ生間質組織を調製し、この構造物を移植または埋め込む方法も報告されている（特表平11-506611号公報）。

また、天然の高分子を用いて靱帯や腱を再構築するための線維芽細胞培養用基材として、コラーゲンのスポンジやファイバー（Dunn, M. G. et al., J. Biomed. Mater. Res., 29, 1363-1371 (1995)）、コラーゲンにグリコサミノグリカンを結合させたスポンジ状の構造物（Torres, D. S., et al., Biomaterials, 21, 1607-1619 (2000)）、ポリ乳酸のファイバーの表面にコラーゲンを結合させた構造物（Ide, A., et al., Mater. Sci. Eng., C17, 95-99 (2001)）、コラーゲンファイバーにノルジヒドログアヤレチン酸を架橋した構造物（Koob, T. J., et al., J. Biomed. Mater. Res., 56, 40-48 (2001)）等を用いて、線維芽細胞の増殖性や靱帯組織の再生検討が報告されている。

しかし、このようなコラーゲンを使用する方法ではコラーゲン基材が生体と同種的なものであることから、これに伴う抗原性や感染が深刻な問題となる可能性が高い。また、コラーゲングルやコラーゲンをういた基材は変位を受けて元に戻る事が困難であり、生体吸収性の合成ポリマーのような変位に対する弾力性に欠けていることも靱帯や腱の再生基材としては大きな問題となる。

これまでの生体吸収性の軟骨細胞培養基材として、ポリグリコール酸やポリ乳酸等の合成高分子を用いたファイバーやスポンジが検討されてきた（特公平6-6155号公報、特表平8-511679号公報、Ito, K. et al., Mat. Res. Soc. Proc., 252, 359-365 (1992), Freed, L. E. et al., J. Biol. Mater. Res., 27, 11-23 (1993)等）。上記合成高分子材料は体内での加水分解物が生体内の代謝中間体と同一であるため毒性がなく、高重合体が得られるため機械的強度を有し、成形が容易であるなどの長所がある。しかし、これらの生体吸収性合成高分子は細胞の接着性に欠けるために、材料表面に生体の細胞接着性因子であるRGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸のトリペプチド）や、ゼラチン、コラーゲン等の生体高分子を固定化する方法によって細胞の接着性を向上させることが検討されてきた（Yamaoka, T. et al., J. Biol. Macromol., 25, 265-271, (1999)等）。しかし、このような化学的固定方法は操作が繁雑であり、また、固定化処理に使用した薬品の残存等も懸念される。

一方、天然高分子を用いた軟骨細胞培養用基材としては、コラーゲンのゲルやスポンジ状基材（特開平6-22744、特表平9-510639、特開2001-224678、Fujisato, T. et al., Biomaterials, 17, 155-162 (1996)等）、キチンやキトサンのスポンジ状基材が検討されてきた（Park, Y. J. et al., Biomaterials, 21, 153-159 (2000)等）。これらの基材は形状安定性および機械的強度に問題がある。また、コラーゲンは原材料費が高価であるとともに、抗原性やBSE等の感染も懸念される。

酸性（アニオン系）高分子と塩基性（カチオン系）高分子の複合体から成る培養基材が報告されている（特開平6-335382号公報、特開平6-277038号公報）が、この方法では両者の溶液を混合し、乾燥させただけの板状や薄膜状構造物であり、それ自体が繊維等から成る多孔性の3次元構造物ではない。

また、上記溶液を適当な材料（ガラスや金属、プラスチック等）の表面に塗布や噴霧する方法も記載されているが、基材全体が生体吸収性のものではないために、生体での吸収性が要求される軟骨組織再生用の培養基材には適用できない。

生体吸収性の酸性高分子と塩基性高分子のハイブリッド繊維を作製する方法が報告されている（特開 2002-291461）。しかし、この繊維の作製方法では酸性高分子であるアルギン酸等を主原料とし、これに極少量の塩基性高分子であるキトサン等を付与するものであるため、例えばアルギン酸を主材料とした繊維は親水性のために培養液中で膨潤し、形状が不安定である。また、酢酸に溶解したキトサンを塩化カルシウム中で紡糸し、ヒアルロン酸溶液中に浸漬した後、巻き取って、乾燥させただけのシート状繊維の周辺にキトサン溶液（酢酸に溶解したもの）を塗布して重ね合せた後、乾燥させたものを 3 次元の培養基材として用いた報告もなされている（岩崎ら、第 75 回日本整形外科学会学術集会、2002. 5. 16-19（岡山）；山根ら、第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会、2001. 10. 18（広島）、第 20 回日本運動器移植・再生医学研究会、2001. 10. 27（京都））。しかし、これらの繊維はキトサンが酢酸塩を形成したまま繊維化されているため、培養溶液中で繊維が少しずつ膨潤したり溶け出し培養中での基材形状の安定性が悪く基材内部での軟骨細胞の増殖性も低下するという問題があった。

20 発明が解決しようとする技術的課題

本発明は組織再生用培養基材に要求される上記条件をすべて満たした動物細胞培養用基材を提供することを目的とする。即ち、本発明は、

1) 動物細胞の培養において細胞の播種が容易であり、播種時、及び増殖した動物細胞が培養基材に容易に吸着・接着する。

2) 軟骨細胞または線維芽細胞等の動物細胞が基材の表面および内部で増殖し、コラーゲンなど細胞外マトリックスが分泌され結合組織を形成する。

3) 形成された結合組織が占め得る 3 次元的空间を有する。

4) 移植後組織が再生するまで十分な機械的強度を有する。

5) 生体適合性および生体吸収性を有し、組織再生後は究極的には消滅する、

動物細胞培養用基材を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、繊維内部がキトサンまたはその塩よりなり、繊維表面がキトサンと生体吸収性の酸性生体高分子との複合体で被覆されているキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維であって、10%FBS（ウシ胎仔血清）を添加したDMEM（Dulbecco's Modified Eagles Medium）培地中に、室温で2週間置いても形態を保持する繊維に関する。「形態を保持する」とは、溶解、または膨潤せずもとの形態を失わないことを言う。

本発明はまた、以下の工程：

1) キトサンを酸の水溶液に溶解しキトサンの塩の水溶液を調製する；

2) キトサンの塩の水溶液を、アルカリ土類金属の塩を凝固剤として用いて湿式紡糸して繊維を形成させる；

3) その繊維を生体吸収性の酸性生体高分子の溶液に浸漬して、繊維表面でキトサンと酸性生体高分子を反応させてキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維を形成させる；

4) 場合によりハイブリッド繊維を延伸する；、

5) ハイブリッド繊維を塩基、2塩基酸以上の無機酸の若しくはその塩、または3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩の水溶液で処理する；

を含む上記繊維の製造方法にも関する。

本発明はまた、以下の工程：

1) キトサンを酸の水溶液に溶解しキトサンの塩の水溶液を調製する；

2) キトサンの塩の水溶液を、塩基、2塩基酸以上の無機酸もしくはその塩、または3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩を凝固剤として用いて湿式紡糸して繊維を形成させる；

3) 形成された繊維を生体吸収性の酸性生体高分子の溶液に浸漬して、繊維表面でキトサンと酸性生体高分子を反応させてキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維を形成させる；

4) 場合によりハイブリッド繊維を延伸する；

ことを含む上記繊維の製造方法にも関する。

本発明はさらに、該繊維よりなる動物細胞培養用 3 次元基材にも関する。動物細胞としては、限定されるものではないが軟骨細胞、線維芽細胞、神経細胞、これらの細胞に分化する未分化細胞を含む。

- 5 本発明は、該 3 次元基材を培養基材として用いて、動物細胞を生体外で培養することを含む動物細胞の培養方法にも関する。

本発明は、上記培養によって得られる、培養基材に増殖した動物細胞が結合した移植用基材にも関する。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の 3 次元基材を用いて培養した軟骨細胞の、培養 21 日目の光学顕微鏡写真を示す模写図である。

図 2 は、同じく軟骨細胞培養 21 日目のアルシアンブルー・サフラニン染色の結果を示す写真の模写図である。

- 15 図 3 は、培養 1 日目、7 日目、14 日目、および 21 日目の 3 次元基材あたりの、軟骨細胞のタンパク質量および酸性ムコ多糖量を示すグラフである。

図 4 は、ウサギの膝関節部位に欠損部を作製し、ここに予め 2 週間ウサギ軟骨細胞を培養した 3 次元基材を移植し、移植後 8 週目に欠損部を開腹しサフラニン O 染色による組織観察を行った結果を示す写真の模写図である。

- 20 図 5 は、培養 1 日目、7 日目、14 日目、および 28 日目の 3 次元基材あたりの、線維芽細胞の DNA 量を示すグラフである。

図 6 は、3 次元基材で 28 日間培養した線維芽細胞を、抗マウス抗体を用いた streptavidin-biotin 法による I 型コラーゲンの免疫組織染色の結果を示す写真の模写図である。

- 25 図 7 は 3 次元基材で 28 日間培養した線維芽細胞の走査型電子顕微鏡写真を示す模写図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者は、繊維内部がキトサンまたはその塩よりなり、繊維表面がキトサンと生体吸収性の酸性生体高分子との複合体で被覆されているキトサン／酸性生体

高分子ハイブリッド繊維であって、10%FBS（ウシ胎仔血清）を添加したDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）培地中に、室温で2週間置いても形態を保持する繊維を製造する2つの方法を考案した。

第一の方法では、先ず塩基性高分子であるキトサンを酸の水溶液に溶解してキトサンの塩の水溶液を調製する。この場合用いる酸としては無機酸または有機酸のいずれでもよい。無機酸の好ましい例は、塩酸、硝酸等の1塩基酸であり、有機酸の好ましい例はギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、アスコルビン酸等である。

キトサン塩の水溶液を湿式紡糸して繊維を調製する。湿式紡糸とは適当な溶剤に溶解した紡糸原液をノズルを通して脱溶媒和力の大きな凝固浴中に押出して凝固させる方法である。

凝固剤としては、カルシウム、マグネシウム、バリウム等のアルカリ土類金属の水溶性の塩、例えばハロゲン塩を用いる。特に好ましいのは塩化カルシウムである。アルカリ土類金属塩を水、水／アルコールの混合溶媒に溶解して用いる。アルカリ土類金属塩の濃度は、10%から飽和濃度まで、好ましくは40～60%である。

上記キトサン塩の水溶液をノズルから凝固剤を含む凝固浴中に押し出して、キトサンを凝固させ繊維を形成させる。形成した繊維はアルコール等の水と相溶性の溶媒／水の混合溶媒に浸漬し過剰の凝固剤を除去する。

本明細書で用いる「酸性生体高分子」とは、カルボキシル基、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基等の酸性の基を有する天然に由来する高分子、またはその塩をいう。好ましい態様では生体高分子は多糖類である。天然に存在する生体高分子をいずれかの物理的、化学的、あるいは酵素的手段により低分子量化したもの、あるいは上記酸性基またはその塩を生じさせたものも「酸性生体高分子」に含む。

カルボキシル基を有する酸性生体高分子の例としては、グルコン酸、グルクロン酸、イズロン酸、D-マンヌロン酸、ガラクトuron酸、グルロン酸、シアル酸、グルタミン酸を含むポリマー、例えばヒアルロン酸、アルギン酸、ヘパリン、ポリグルタミン酸等が挙げられる。

硫酸基を有する酸性生体高分子の例としてはコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸等が挙げられる。リン酸基を有す

る酸性生体高分子の例としてはDNA、RNA等が挙げられる。複合体の製造においてこれらの酸性生体高分子の2種以上を用いてよい。酸性生体高分子の好ましい例はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸である。

5 キトサンと酸性生体高分子との複合体とは正の電荷を有するキトサンと負の電荷を有する酸性生体高分子との間の静電的相互作用により形成される複合体をいう。複合体の生成には酸性生体高分子とキトサンを適当な媒体、例えば水中で接触させればよい。キトサン／酸性生体高分子複合体を生成させる場合、両者の水溶液を混合する必要は必ずしも無く、固体のキトサンに酸性生体高分子の溶液を接触させればよいことを見出した。

10 酸性生体高分子を水または水／アルコールの混合溶媒等に溶解した溶液を調製する。酸性生体高分子の濃度は0.01～10%、好ましくは0.05～1%とする。上記キトサン繊維を酸性生体高分子の溶液に浸漬すると、繊維表面で塩基性高分子であるキトサンと酸性生体高分子の複合体が形成される。この繊維は内部がキトサン塩で表面がキトサンと酸性生体高分子の複合体で被覆されたハイブリッド繊維である。該繊維は場合により延伸してもよい。複合体の生成反応は延伸後に行ってもよい。

15 このようにして生成した繊維を、無機塩基、2塩基酸以上の無機酸若しくはその塩、3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩の水溶液または水／水と相溶性有機溶媒混合物溶液で後処理する。この後処理を行わないと培養基材として用いた場合に培養液中で繊維が徐々に溶解し、基材の形態の安定性が保てない。無機塩基の例としてはNaOH、KOHなどのアルカリ金属水酸化物を含む。2塩基酸以上の無機酸の例は硫酸、リン酸等であり、その塩の例は、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸水素ナトリウム等及びこれらに対応するカリウム塩、アンモニウム塩を含む。3塩基酸以上の有機酸の例はクエン酸、エチレンジアミン四酢酸、1, 1, 2-トリカルボキシエタン、1, 1, 2-トリカルボキシ-2-メチルエタン、1, 1, 3-トリカルボキシプロパン、1, 2, 3-トリカルボキシプロパン、1, 1, 2, 2-テトラカルボキシエタン、1, 2, 2, 3-テトラカルボキシプロパン等を含む。これら後処理剤の濃度は0.1～

10%、好ましくはアルカリ金属水酸化物等の無機塩基は0.2~1%、無機酸および有機酸は1~3%である。処理後、十分水で洗浄して、次にメタノール等に浸漬して脱水し、乾燥する。

第2の製造方法では凝固剤として無機塩基、2塩基酸以上の無機酸若しくはその塩、3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩を用いること、及び後処理を行わない点が第1の方法と異なる。すなわち、キトサンを酸の水溶液に溶解しキトサンの塩の水溶液を調製し；キトサンの塩の水溶液を、塩基、2塩基酸以上の無機酸もしくはその塩、または3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩を凝固剤として用いて湿式紡糸して繊維を形成させる。形成した繊維はアルコール等の水と相溶性の溶媒／水の混合溶媒に浸漬し、過剰の凝固剤を除去する；その繊維を生体吸収性の酸性生体高分子の溶液に浸漬して、繊維表面でキトサンと酸性生体高分子を反応させてキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維を形成させ、場合によりハイブリッド繊維を延伸することにより製造する。凝固剤としての無機塩基、2塩基酸以上の無機酸若しくはその塩、3塩基酸以上の有機酸もしくはその塩の例は第1の製造方法の後処理剤として挙げたのと同様である。凝固剤の濃度は0.5~30%とする。キトサン濃度、キトサンを溶解するに必要な酸の種類および濃度、酸性生体高分子の溶液の濃度は第1の製造方法と同様でよい。

このようにして製造される、繊維内部がキトサンまたはその塩よりなり、表面がキトサンと酸性生体高分子の複合体で被覆されたキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維は、相当の強度を有し、軟骨細胞や線維芽細胞等の動物細胞がよく付着するとともに、生体吸収性であり、生体適合性を有する。

動物細胞の移植用基材として用いるために、基材はその内部に細胞が増殖し、細胞から分泌されたマトリックスを保持しうる空間を有し、力が加わった場合の形態安定性および強度を有する3次元基材とすることが必要である。上記要件を満たす3次元基材は、本発明の方法で製造したハイブリッド繊維から製造する織物、編物、または組み紐より製造できる。織物、編物、または組み紐は従来公知の方法により製造できる。織物、編物または組み紐は必要に応じ折り重ね、または積み重ねて、厚みを生じさせる。折り重ね、積み重ねた織物、編物または組み紐は本発明の繊維を用いて固定して一体化する。また折り重ね、積み重ねた織物、

編物または組み紐はその内部に該繊維をこれら以外の形態で含んでいてもよい。

3次元基材の形状は損傷部に応じて変化させる。

従って本発明の3次元基材は培養基材として以下のような好ましい性質を有する。

- 5 1) 軟骨細胞または線維芽細胞等の動物細胞の培養において細胞の播種が容易であり、播種時、及び増殖した軟骨細胞または線維芽細胞等の動物細胞が培養基材に吸着・接着する。
- 2) 軟骨細胞または線維芽細胞等の動物細胞が基材の表面および内部で増殖し、コラーゲンなど細胞外マトリックスが分泌され結合組織を形成する。
- 10 3) 形成された結合組織が占め得る3次元的空间を有する。
- 5) 移植後組織が再生するまで十分な機械的強度を有する。
- 4) 生体適合性および生体吸収性を有し、組織再生後は究極的には消滅する。

上記の3次元培養基材を用いる動物細胞の培養は通常の動物細胞培養法（例えば、Klagsburn, M., "Large Scale Preparation of Chondrocytes", *Methods in Enzymol.*, 58:560(1979) を参照）に準じて行う。先ず、予め、該培養基材をオートクレープで加熱滅菌するか、ガス殺菌等を行い形状・特性が壊れないように殺菌処理を施し、殺菌した培地に添加する。次に、動物細胞を培養基材上にできるだけ3次元的に均一に播いて培養する。培養に使用する細胞としてはウサギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ヒト等の哺乳動物由来の細胞であれば、いずれの細胞でも培養可能である。好ましい細胞は、ヒト由来のものであり、特に好ましいのは移植しようとする患者由来の細胞である。

培地としては、通常の動物細胞培養法で用いられるもの、例えばヒト血清を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) などが使用出来る。培地にはいずれかの成長因子、例えばTGF β (トランスフォーミング成長因子- β)、FGF (線維芽細胞増殖因子), ChM-1 (コンドロモジェリン-1) などを添加してもよい。

播種した細胞が培養基材上で良好に増殖、分化するためには細胞付着・吸着性の高い培養基材は極めて重要である。

生体内の軟骨組織には血管が発達していないことから低酸素条件となっている

こと、また、体重による圧負荷を受けていることから、これらの生体条件に近い条件での培養も有効と考えられる。このため軟骨細胞の培養では、1～15%の低酸素条件下で行うことや、0.1～20 MPa（周期負荷の場合には0.01～2 Hz）の圧をかけて培養を行うこと、およびこれらの条件を組み合わせで培養することも可能である。圧を負荷する方法については、具体的にはポンプやピストン状のものを用いて培地に空気圧や水圧を加える方法等がある。

また、靱帯や腱組織では引っ張り応力が加えられており、これに近い条件下での培養も有効と考えられる。このため、線維芽細胞の培養では0.01～50 mm/cm（周期負荷の場合には0.01～2 Hz）の引っ張り刺激下で培養を行ってもよい。引っ張り刺激の負荷は具体的には、培地に浸けた基材の両端を伸縮性を有する器具等に固定し、一定の伸縮変化を加えることにより行う。

軟骨細胞の培養では、少なくとも細胞外マトリックスが形成されるまで行なう。通常、培養2～4週間程度で軟骨細胞が本発明の3次元培養基材の上に良好に接着、増殖し、コラーゲン様の細胞外マトリックスが形成される。

このようにして製造される、本発明の、キトサンと酸性生体高分子とのハイブリッド繊維よりなる3次元基材、及び3次元基材に付着した軟骨組織を含む基材は、軟骨損傷の修復のための移植用基材として好適に用いることができる。

線維芽細胞の培養は、少なくとも細胞外マトリックスが形成されるまで行なう。通常、培養2～4週間程度で線維芽細胞が本発明の3次元培養基材の上に良好に接着、増殖し、コラーゲン様の細胞外マトリックスが形成される。場合によっては、体外で十分な移植用組織を作製するために、2ヶ月程度の培養を行う。

このようにして製造される、本発明の、キトサンと酸性生体高分子とのハイブリッド繊維よりなる3次元基材、及び3次元基材に付着した線維芽細胞を含む基材は、靱帯や腱の修復のための移植用基材として好適に用いることができる。

未分化細胞を用いる場合には、例えば骨髄液から間葉系幹細胞を密度勾配遠心法等で分離した後、DEME等の培地にTGF- β やFGF等の成長因子を添加して軟骨細胞や線維芽細胞へ分化させた後、3次元基材上に播種し、増殖・分化させることも可能である。また、基材上への細胞の播種は未分化細胞の状態で行うこともできる。

また、神経幹細胞を用いてEGF(上皮増殖因子)等を培地に添加し神経細胞に分化させた後、3次元基材上に播種し、増殖・分化させることも可能である。また、基材上への細胞の播種は未分化細胞の状態で行うこともできる。

以下に本発明を実施例により説明する。本発明がこれら実施例に限定されるものではないことは明かである。

実施例

実施例 1

キトサンとヒアルロン酸のハイブリッド繊維 (1) および (2) の製造

8 (重量/容量) %のキトサン (君津化学工業社製、F 2 P、分子量: 約 165,000) を 4 %酢酸水溶液に溶解した溶液をカラム (ガラス製、内径 4.5 mm、長さ 410 mm) に詰め、濾布で加圧 (0.6 kgf/cm^2) 濾過した。この濾液を紡糸用カラム (ガラス製、内径 4.5 mm、長さ 410 mm) に詰め、これを紡糸液として簡易紡糸装置を用い、以下のような方法によって繊維を作製した。

50ホール (小孔: $\phi 0.1 \text{ mm}$) のノズルから、 0.8 kgf/cm^2 の加圧下で飽和塩化カルシウム溶液中 (第1凝固浴: 水/メタノール = 1/1 (容量)、浴長 100 cm、容量約 2 L) に上記紡糸液を押出し、次に水/メタノール = 1/1 (容量) に浸漬 (第2凝固浴: 浴長 50 cm、容量約 1 L) し、さらに 0.05 %ヒアルロン酸溶液 (水/メタノール = 1/1 (容量)) に浸漬 (第3凝固浴: 浴長 50 cm、容量約 150 ml) した後、ローラー (第1ローラー: 速度 3.2 m/min 、第2ローラー: 3.2 m/min 、延伸倍率 1.0) にかけて、最後に巻取りローラーで巻き取った後、0.8 % (重量/容量) の水酸化ナトリウム溶液 (水/メタノール = 1/9 (容量)) に約 15 時間浸漬後、水洗し、さらにメタノールに約 2 時間浸漬後取り出し室温で風乾させ、またはローラーから糸状に巻取りそのまま室温で風乾させ、しなやかなキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維 (以下、「キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維 (1)」と呼ぶ) を得た。

第3凝固浴中のヒアルロン酸濃度を 0.1 % (重量/容量) としたことを除いて、上記と同様な方法で紡糸を行ない、しなやかなキトサン-ヒアルロン酸ハイ

ブリッド繊維（以下、「キトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（２）」と呼ぶ）を得た。

比較例 1

5 後処理を行わないハイブリッド繊維の製造

紡糸後水酸化ナトリウム溶液で後処理を行わないことを除いては実施例 1 のキトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（１）と同条件で繊維を製造した。

比較例 2

10 キトサン単独繊維（a）の製造

第 3 凝固浴中にヒアルロン酸を添加しないことを除いて、実施例 1 と同様な方法で紡糸を行ない、キトサン単独の繊維（以下、「キトサン繊維（a）」と呼ぶ）を得た。

15 実施例 2

キトサンとヒアルロン酸とのハイブリッド繊維（３）および（４）の製造

3. 5（重量／容量）％のキトサン（君津化学工業社製、B、分子量：約 60,000）を 2％水酢酸に溶解した溶液をカラムに詰め、濾布で加圧ろ過した。この濾液を紡糸用カラムに詰め、これを紡糸液として簡易紡糸装置を用い、以下
20 のような方法によって繊維を作製した。50 ホール（小孔：0.1 mm ϕ ）のノズルから、0.8 kgf/cm²の加圧下で 53（重量／容量）％塩化カルシウム溶液中（第 1 凝固浴：水／メタノール＝1／1（容量）、浴長 100 cm、容量約 2 L）に上記紡糸液を押出し、次に水／メタノール＝1／1（容量））に浸漬（第 2 凝固浴：浴長 50 cm、容量約 1 L）、さらに 0.05％ヒアルロン酸
25 溶液（水／メタノール＝1／1（容量））に浸漬（第 3 凝固浴：浴長 50 cm、容量約 150 ml）した後、ローラー（第 1 ローラー：速度 4.4 m/min、第 2 ローラー：4.5 m/min；延伸倍率 1.02）にかけ、最後に巻取りローラーで巻き取った後、0.2％（重量／容量）の水酸化ナトリウム溶液（水／メタノール＝1／9（容量））に約 15 時間浸漬後、水洗し、さらにメタノール

に約2時間浸漬後、そのまま乾燥、またはローラーから巻取り糸状にして乾燥させることによって、しなやかなキトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（以下、「キトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（3）」と呼ぶ）を得た。

5 第3凝固浴中のヒアルロン酸濃度を0.1%（重量/容量）としたことを除いて、上記と同様な方法で調整、紡糸を行ない、しなやかなキトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（以下、「キトサンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維（4）」と呼ぶ）を得た。

比較例3

10 キトサン単独繊維（b）の製造

第3凝固浴中にヒアルロン酸を添加しないことを除いて、実施例2と同様な方法で紡糸を行ない、キトサン単独の繊維（以下、「キトサン繊維（b）」と呼ぶ）を得た。

15 実施例3

種々の後処理剤を用いるハイブリッド繊維の製造

実施例2において後処理剤の0.2%（重量/容量）の水酸化ナトリウム溶液（水/メタノール=1/9（容量））の代わりに以下の化合物を後処理剤として用いたことを除けば実施例2と同様にして（ヒアルロン酸濃度0.05%）キト

20 サンーヒアルロン酸ハイブリッド繊維を得た。

表1

後処理剤	濃度	溶媒組成
炭酸カリウム	2%	水/メタノール=1/9（容量）
炭酸ナトリウム	2%	水/メタノール=1/1（容量）
25 炭酸水素ナトリウム	1%	水/メタノール=1/1（容量）
炭酸水素ナトリウム	3%	水/メタノール=3/2（容量）
リン酸3カリウム	2%	水/メタノール=1/1（容量）
リン酸水素2カリウム	2%	水/メタノール=1/1（容量）
リン酸2水素ナトリウム	2%	水/メタノール=1/1（容量）

硫酸ナトリウム	2%	水／メタノール＝3／2（容量）
クエン酸	3%	水／メタノール＝1／9（容量）

実施例 4

5 種々の凝固剤を用いるハイブリッド繊維の製造

3. 5（重量／容量）％のキトサン（君津化学工業社製、B、分子量：約600,000）を2％酢酸に溶解した溶液をカラムに詰め、濾布で加圧ろ過した。この濾液を紡糸用カラムに詰め、これを紡糸液として簡易紡糸装置を用い、以下のような方法によって繊維を作製した。50ホール（小孔：0.1mmφ）のノズルから、0.8kgf/cm²の加圧下で表2に示す各種凝固液中（第1凝固浴：浴長100cm、容量約2L）に上記紡糸液を押出し、次に水／メタノール＝1／1（容量）に浸漬（第2浴：浴長50cm、容量約1L）した。次に0.05％ヒアルロン酸溶液（水／メタノール＝1／1（容量））に浸漬（浴長50cm、容量約150ml）した後、ローラー（第1ローラー：速度4.4m/min、第2ローラー：4.5m/min；延伸倍率1.02）にかけ、最後に巻取りローラーで巻き取った。その後、水に10分間浸漬後もう一度水洗し、さらにメタノールに約2時間浸漬脱水後、乾燥させて繊維を得た。

表 2

	凝固剤	濃度	溶媒組成
20	水酸化ナトリウム	5%	水／メタノール＝1／1（容量）
	炭酸カリウム	5%	水／メタノール＝1／1（容量）
	リン酸3カリウム	5%	水／メタノール＝1／1（容量）
	硫酸ナトリウム	5%	水／メタノール＝2／1（容量）

25 実施例 5

キトサンとアルギン酸のハイブリッド繊維の製造

実施例2において0.05％ヒアルロン酸に変えて、それぞれ0.05％および0.1％アルギン酸を用いた外は実施例2と同様にしてキトサンとアルギン酸のハイブリッド繊維を製造した。

実施例6

キトサンとヒアルロン酸ハイブリッド繊維の引張強度試験

実施例1及び2で作製した各繊維の引張強度および伸度を測定した。破断時の荷重および伸び率の測定はJIS繊維規格L1015に従った。また、各繊維の断面積は顕微鏡下での画像処理により求めた。

繊維の破断力および伸度（伸び）の測定方法：

糸状の各繊維（モノフィラメントが50本束になったもの）を長さ約40mmに切断し、両端をそれぞれ接着性のある紙（ここではポストイットを使用）で挟み、標点間距離を20mmにした各サンプルを作製した。このサンプルの両端をクリップ式つかみ具（製品番号343-06742-03、島津製作所製）に固定し、上端側のつかみ具をロードセル（20N、製品番号346-51294-07、島津製作所製）につるした後、卓上型精密万能試験機（AGS-H、製品番号346-51299-02、島津製作所製）にセットした。引張速度20mm/minで垂直方向に引張り、破断点での力および変位から破断力および伸度（伸び）を測定し、これらのデータをパソコン（IBM、NetVista A40）に取込んだ。測定およびデータの解析には専用のソフト（TRAPEZ IUM、島津製作所製）を使用した。

繊維断面積の測定方法：

糸状の各繊維（モノフィラメントが50本束になったもの）を長さ約5mmに切断し、これらを直径約1mmφの小孔をあけたプラスチック板の穴に挿し固定した。このプラスチック板を光学顕微鏡（BX50、オリンパス光学工業社製）の台座に乗せ、繊維断面の画像をCCDカメラを含むカメラコントロールユニット（ICD-740、池上通信機社製）を通して捕らえた後、画像処理装置（VIDEO MICRO METER:Model VM-30、オリンパス光学工業社製、モニター画面：TM1150、池上通信機社製）によって断面積を測定した。

各繊維の強度及び伸度を表3に示す。

表3

キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維（1）および（2）の強度および伸度

(平均値±標準誤差、n = 5)

繊維の種類	最大点破断力 (N)	断面積 (μm^2)	強度 (N/mm^2)	伸度 (%)
キトサン繊維 (a)	1.56 ± 0.06	12199.64 ± 205.47	128.07 ± 4.87	4.26 ± 0.41
キトサン-ヒアルロン酸 ハイブリッド 繊維 (1)	2.35 ± 0.08	15397.20 ± 187.03	152.61 ± 5.39	6.11 ± 0.72
キトサン-ヒアルロン酸 ハイブリッド 繊維 (2)	4.10 ± 0.16	18843.20 ± 284.69	217.55 ± 8.47	3.14 ± 0.28

キトサン単独繊維の強度は約 $130 \text{ N}/\text{mm}^2$ であったが、ヒアルロン酸とのハイブリッド化によって繊維強度は約 $150 \sim 220 \text{ N}/\text{mm}^2$ まで上昇した。

- 5 なお、コラーゲンファイバーにノルジヒドログアヤレチン酸を架橋した構造物(ファイバー)での強度は約 $50 \text{ N}/\text{mm}^2$ である (Koob, T. J., et al., J. Biomed. Mater. Res., 56, 40-48 (2001)) ことから、本発明のキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維の強度はコラーゲン繊維に比べて3～5倍程度の強度を有することが確認された。

10 表4

キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維(3)および(4)の強度および伸度
(平均値±標準誤差、n = 5)

繊維の種類	最大点破断力 (N)	断面積 (μm^2)	強度 (N/mm^2)	伸度 (%)
キトサン繊維 (b)	2.86 ± 0.03	15576.08 ± 332.20	183.60 ± 1.65	2.54 ± 0.16
キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維 (3)	4.17 ± 0.08	19165.34 ± 133.35	217.60 ± 3.93	5.89 ± 0.26
キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維 (4)	3.58 ± 0.06	18031.82 ± 243.88	198.51 ± 3.47	4.55 ± 0.22

実施例 7キトサンとヒアルロン酸とのハイブリッド繊維の軟骨細胞の接着性

軟骨細胞が基材上で良好な増殖・分化を起こすためには、軟骨細胞が培養基材
 5 出来るだけ多く接着することが必要である。このため、実施例 2 で作製したキ
 トサン単独繊維およびキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維への軟骨細胞の
 接着性を評価した。比較対象として市販の医療用吸収性縫合糸（生体吸収性合成
 高分子）：ポリグラクチン-910（Vicryl 3-0, EthiconCo, NJ, USA）を用い
 た。

10 軟骨細胞は日本白色家兎（8週齢、体重1.8～2.0kg）の膝関節部位か
 ら分離調整した。軟骨細胞の濃度は $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ とし、細胞の接
 着性評価は西村の方法（Nishimura, J. Biol. Macromol. 7, 100-104, 1985）に準
 じた。すなわち、各繊維を10mmの長さに切断し、テフロンチューブ（内径：
 5mm、長さ：30mm）に一定量（100mg）ずつ密に詰めた後、このチュ
 15 ーブの片端から軟骨細胞を含む試料液100 μl を添加し、37℃で1時間イン
 キュベートした。その後、PBS（リン酸緩衝食塩水）1mlを流し、得られた
 流出液中の細胞数をカウントし、細胞流出率を算出した。

表 5

各種繊維の軟骨細胞接着性の比較

試 料	細胞流出率 (%) (平均値 \pm 標準誤差, n=5)
Vicryl	64.2 \pm 7.5
キトサン繊維	13.0 \pm 2.5 *
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (3)	11.1 \pm 6.4 *
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (4)	26.9 \pm 6.6 *

*,p<0.05 vs Vicryl

上記に示すようにVicrylと作製した生体高分子繊維との間には細胞接着性に

ANOVAによる統計処理で有意な差が認められた。

実施例 8

キトサンとヒアルロン酸ハイブリッド繊維の線維芽細胞接着性

- 5 線維芽細胞をうまく培養するためには、線維芽細胞が3次元培養基材に出来るだけ多く接着することが必要である。実施例1で作製したキトサン単独繊維およびキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維への線維芽細胞の接着性を検討した。コントロールとして市販の医療用吸収性縫合糸：ポリグラクチン-910 (Vicryl, Ethicon Co, NJ, USA) を用いた。

10 (試験方法)

- 線維芽細胞は滅菌下で日本白色家兎（8～10週齢、体重1.8～2.0 kg）の膝蓋腱から分離調製した。線維芽細胞の濃度は 1×10^7 cells/mlとし、細胞の接着性は西村の方法（Nishimura, J. Biol. Macromol. 7, 100-104, 1985）に準じて評価した。つまり、各繊維を5mmの長さに切断し、テフロン（登録商標）チューブ（内径：5mm、長さ：30mm）に一定量詰めた。このチューブの片端から線維芽細胞を含む試料液1mlを添加し、室温で15分間インキュベートした後、PBS（リン酸緩衝食塩液）1mlを流し、得られた洗浄液中の細胞数をカウントし、繊維に接着していない細胞数とした。

表 6

20 各種繊維の線維芽細胞接着性の比較

試 料	流出した線維芽細胞数 (平均値±標準誤差、 n=5)
Vicryl	151.1±4.8
キトサン繊維	44.4±7.2 *
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (1)	12.0±3.1 *, **
キトサン-ヒアルロン酸繊維 (2)	14.8±7.7 *, **
* : Vicryl に対し危険率0.05で有意差あり ** : キトサン繊維に対し危険率0.05で有意差あり	

上に示すようにVicrylと作製した生体高分子繊維との間には細胞接着性に分散

分析法 (ANOVA : analysis of variance) による統計処理で有意な差が認められた。キトサン単独繊維とキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維との間にも有意差があり、線維芽細胞の接着性はハイブリッド繊維の方が良いことが認められた。

5

実施例 9

培養液中での繊維の安定性

実施例 1 ~ 4 で製造した各キトサン/ヒアルロン酸ハイブリッド繊維、比較例 1 で製造したキトサン/ヒアルロン酸ハイブリッド繊維、比較例 2 および 3 で製造したキトサン単独繊維、各約 20 mg ずつを試験管に入れ、これに 10 % FBS (ウシ胎仔血清) を添加した DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma 社製、コード D5796) 培養液 2 ml を加えて、室温で 2 週間放置した。

10

15

このうち比較例 1 のハイブリッド繊維の内、塩化カルシウムを凝固剤として用い、後処理を行わなかった繊維では繊維の形状が不鮮明となり、培養液の色も黄色に変化した。他の繊維では、形状変化は全く見られず、培養液の色も元の赤色のままであった。

実施例 10

20

キトサンとヒアルロン酸とのハイブリッド長繊維からの 3 次元培養基材の作製

実施例 1 の方法で紡糸後、水酸化ナトリウムおよびメタノール処理した繊維 (ローラーに巻いたまま) から 100 m 以上の長い繊維 (長繊維) を作製した。

さらにこの長繊維を撚糸した後、市販の編組機を用いて、帯状構造物を作製した。これを用いて一定形状を有する 3 次元の培養基材を作製した。

25

実施例 11

3 次元基材を用いた軟骨細胞の培養

実施例 10 の 3 次元基材を用いて軟骨細胞の培養試験を実施した。

Kawasaki ら、および Yasui らの方法 (Kawasaki, K., et al., J. Cell Physiol.,

179, 142-148 (1999), Yasui, N., et al., Exp. Cell Biol., 50, 92-100 (1982)) に準じて軟骨細胞の採取および培養を行った。すなわち、日本白色家兎（8週齢、体重1.8～2.0 kg）の膝関節部位から軟骨組織片を採取し、0.25%トリプシン溶液を添加して37℃で25分間処理した後、0.25%コラゲナーゼ（タイプII）溶液を添加し、37℃で5時間程度処理を行い、細胞を単離した。この細胞浮遊液を50 μ l 採取しトリパンブルー50 μ lを加えた後、良く攪拌した後、20 μ lを血球計算盤に乗せて細胞数をカウントし、全細胞数を算出した。予めオートクレーブ滅菌しておいたキトサンーヒアルロン酸ハイブリッド3次元基材をマルチウェルプレート（12ウェル、Falcon社製）に入れ、繊維上に各ウェル当たり 5×10^5 個となるように軟骨細胞を含む溶液約100 μ lを添加した。5%CO₂存在下、37℃の培養器で1時間インキュベートした後、DMEM培地2 mlを少量ずつ添加し、さらに0.1%アスコルビン酸ホスフェート20 μ lを加えて、上記条件下で培養した。

図1には培養21日目の光学顕微鏡写真を示したが、播種した軟骨細胞は繊維上および繊維間の隙間で良好に増殖していることが確認された。また、図2にはアルシアンブルー・サフラニン染色の結果を示したが、青色に強く染色された細胞外マトリックスが多数確認された。以上のことから、この繊維上で軟骨細胞は順調に増殖・分化し、コンドロイチン硫酸等の細胞外マトリックスを盛んに産生していることが判る。また、図3には、培養1日目、7日目、14日目および21日目の3次元基材当りのタンパク量および酸性ムコ多糖量の測定結果を示したが、培養に伴って両者とも増加した。これらのことから軟骨細胞は良好な増殖・分化によって各種タンパクの合成およびコンドロイチン硫酸等の細胞外マトリックスを産生していることが判る。

実施例12

培養した3次元基材の動物への移植における軟骨組織再生評価

麻酔下で日本白色家兎（8週齢、体重1.8～2.0 kg）の膝関節部位に約4×6 mm、深さ約1.5 mmの欠損部を作製し、ここに予め2週間ウサギ軟骨細胞を培養した実施例10の3次元基材を移植し、基材の両側を生体吸収性の

縫合糸で軽く固定した。移植後8週目に欠損部を開腹しサフラニンO染色による組織観察を行った結果、培養基材を移植した欠損部位に赤く染色された軟骨基質が認められ、軟骨組織の再生が起こっていることを確認した。なお、基材の固着性も非常に良好であり、また、基材自体は次第に吸収されている様子が観察された(図4)。また、基材移植に伴う炎症細胞等の浸潤は殆ど見られなかったことから、基材移植に伴う強い異物反応は起こっていないものと考えられる。

実施例13

3次元基材を用いた線維芽細胞の培養

Martinの方法(Martin, G.M., Tissue Culture, Methods and Applications, Academic Press, 39, 1973) に準じて線維芽細胞の採集および培養を行った。すなわち日本白色家兔(8~10週齢、体重1.8~2.0kg)の膝蓋腱から2mm角の小片を作製し、カバーガラスをかけて直径35mmのシャーレに固定した。これに10%FBSを添加したDMEMを加え、5%CO₂存在下、37℃の培養器で2週間培養した。線維芽細胞がコンフルエントな状態になったところで培地を除き、PBS(-)で洗浄した。0.25%トリプシン0.5mlを加えて37℃で15分間インキュベート後、培地1mlを添加し、細胞を回収した。この細胞懸濁液50μlに0.04%トリパンブルー50μlを加え血球計算盤で細胞数をカウントした。予めオートクレーブ滅菌しておいたキトサンとヒアルロン酸とのハイブリッド繊維から成る実施例10の3次元基材を12穴のプレートに置き、繊維上に各プレート当たり1×10⁶個となるように線維芽細胞を含む溶液約100μlを添加した。5%CO₂存在下、37℃の培養器で1時間インキュベートした後、DMEM培地約2mlを添加し上記条件下で培養した。培養後1日目、7日目、14日目および28日目に、細胞数の指標であるDNA量を測定した。

測定は、Ragoらの方法(Rago, R., et al., Anal. Biochem., 191, 31-34 (1990)) に準じて行った。即ち、0.05Mのリン酸緩衝液(pH7.4)に塩化ナトリウムを添加して2M溶液とした。培養した線維芽細胞を基材ごと取り出し、PBSで培地を洗い流した。ハサミを用いて基材を細かく刻んだ後1.5m

L容量のチューブに移し、0.05Mリン酸緩衝液（2M 塩化ナトリウムを含む、pH7.4）を1mL添加してよく攪拌し、室温で1分間放置した。この溶液を再度よく攪拌した後、その上清部分を試料溶液とした。試料溶液100 μ Lに0.05Mリン酸緩衝液（2M 塩化ナトリウムを含む、pH7.4）2mL
5 を加え、さらに蛍光試薬（Hoechst 33258、0.02%溶液を精製水により調製）を10 μ L添加して十分攪拌した後、分光蛍光光度計（RT-5300PC、島津製作所社製）を用いて蛍光強度（励起波長356nm、吸収波長458nm）を測定した。標品のDNAを用いて0~125 μ g/mLの範囲で検量線を作成した後、この検量線から各試料溶液中に含まれるDNA濃度を求
10 めた。図5に示したように、培養に伴ってDNA量は増加し、3次元基材上で線維芽細胞が良好に増殖することを確認した。

また、図6には抗マウス抗体を用いたstreptavidin-biotin法によるI型コラーゲンの免疫組織染色の結果（3次元基材で28日間培養したもの）を示したが、細胞外基質が染色されており、このハイブリッド繊維から作製した3次元基材は
15 靱帯および腱組織の細胞外マトリックスであるタイプIコラーゲンの産生にも優れていることを確認した。図7には、この3次元基材を用いて28日間培養した場合の走査型電子顕微鏡像を示した。資料の作製方法は以下のとおりである。

0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.2）を調製した。このリン酸緩衝液200mLにシヨ糖6.85gを添加し、0.1Mシヨ糖含有0.1Mリン酸緩衝液を作
20 製した。また同様に、0.2Mシヨ糖含有0.2Mリン酸緩衝液（pH7.2）を作製した。さらに、0.2Mシヨ糖含有0.2Mリン酸緩衝液を用いて2%オスミウム酸溶液を2倍に希釈した1%オスミウム酸溶液を調製した。

28日間培養した基材を0.1Mシヨ糖加0.1Mリン酸緩衝液中に浸漬し、37℃で10分間放置した。この操作を3回繰り返した後、2%グルタルアルデ
25 ヒド溶液（0.1Mリン酸緩衝液で調製）中に浸漬し、37℃で1時間放置して前固定処理を行った。この細胞を含む基材を0.1Mシヨ糖加0.1Mリン酸緩衝液中に浸漬し、37℃で10分間放置して洗浄した。この操作を3回繰り返した後、室温で1%オスミウム酸溶液に1時間浸漬した後固定処理を行った。さらに導電染色を行うために、0.1Mリン酸緩衝液を用いて洗浄した後、室温で

2%タンニン酸水溶液に2時間浸漬し、続いて0.1Mリン酸緩衝液中に2時間浸漬した。その後、2%オスミウム酸溶液（シヨ糖を0.34g/10mL添加）中に2時間浸漬し、再び0.1Mリン酸緩衝液中に2時間浸漬した。

この基材を20%エタノールから順次10%間隔で濃度を上げたエタノール溶液

- 5 (20~99.5%)に10分間ずつ浸け、最後に無水エタノールに30分間、2回浸漬して脱水した。その後、酢酸イソアミル中に30分間2回浸漬を繰り返して、エタノールから酢酸イソアミルへの置換を行った。液化CO₂を移行液として用いて臨界点乾燥処理（31℃、72.8気圧）を行った試料にイオン・スパッタ装置（E-102、日立製作所社製）を用いて白金-パラジウム蒸着処理
- 10 を行った後、走査型電子顕微鏡（S-2300型、日立製作所社製）を用いて3次元基材での線維芽細胞の増殖・分化の状況を観察した。その結果、線維芽細胞は3次元基材の表面で増殖・分化し、その周辺にはコラーゲンと思われる多数の糸状物質が観察された（図7）。

請 求 の 範 囲

1. 繊維内部がキトサンまたはその塩よりなり、繊維表面がキトサンと生体吸収性の酸性生体高分子との複合体で被覆されているキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維であって、10% FBS（ウシ胎仔血清）を添加したDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）培地中に、室温で2週間置いても形態を保持する繊維。

2. 酸性生体高分子がヒアルロン酸、アルギン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸およびポリグルタミン酸よりなる群から選択される請求の範囲第1項に記載のハイブリッド繊維。

3. 以下の工程：

1) キトサンを酸の水溶液に溶解しキトサンの塩の水溶液を調製する；

2) キトサンの塩の水溶液を、アルカリ土類金属の塩を凝固剤として用いて湿式紡糸して繊維を形成させる；

3) その繊維を生体吸収性の酸性生体高分子の溶液に浸漬して、繊維表面でキトサンと酸性生体高分子を反応させてキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維を形成させる；

4) 場合によりハイブリッド繊維を延伸する；、

5) ハイブリッド繊維を塩基、2塩基酸以上の無機酸もしくはその塩、または3酸塩基以上の有機酸もしくはその塩の水溶液で処理する；

ことを含む請求の範囲第1項に記載の繊維の製造方法。

4. 以下の工程：

1) キトサンを酸の水溶液に溶解しキトサンの塩の水溶液を調製する；

2) キトサンの塩の水溶液を、塩基、2塩基酸以上の無機酸もしくはその塩、または3酸塩基以上の有機酸もしくはその塩を凝固剤として用いて湿式紡糸して繊維を形成させる；

3) その繊維を生体吸収性の酸性生体高分子の溶液に浸漬して、繊維表面でキトサンと酸性生体高分子を反応させてキトサン／酸性生体高分子ハイブリッド繊維を形成させる；

- 4) 場合によりハイブリッド繊維を延伸する；
ことを含む請求の範囲第1項に記載の繊維の方法。
5. 請求の範囲第1項に記載の繊維よりなる動物細胞培養用3次元基材。
6. 動物細胞が軟骨細胞である請求の範囲第5項に記載の3次元基材。
- 5 7. 動物細胞が線維芽細胞である請求の範囲第5項に記載の3次元基材。
8. 動物細胞が未分化細胞である請求の範囲第5項に記載の3次元基材。
9. 請求の範囲第6項に記載の3次元基材を用いて、軟骨細胞を生体外で培養することを含む軟骨細胞の培養方法。
10. 培養時に成長因子を添加する請求の範囲第9項に記載の培養方法。
- 10 11. 培養を1～15%の低酸素条件下で行うこと、および／または0.1～20 MPaの圧負荷下で行うことを含む請求の範囲第9または10項に記載の培養方法。
12. 請求の範囲第7項に記載の3次元基材を用いて、線維芽細胞を生体外で培養することを含む線維芽細胞の培養方法。
- 15 13. 培養時に成長因子を添加する請求の範囲第12項に記載の培養方法。
14. 培養を0.01～50 mm/cmの引張り刺激を加えながら行う請求の範囲第12または13項に記載の培養方法。
15. 請求の範囲第8項に記載の3次元基材を用いて、未分化細胞を生体外で培養することを含む動物細胞の培養方法。

1/5

図 1

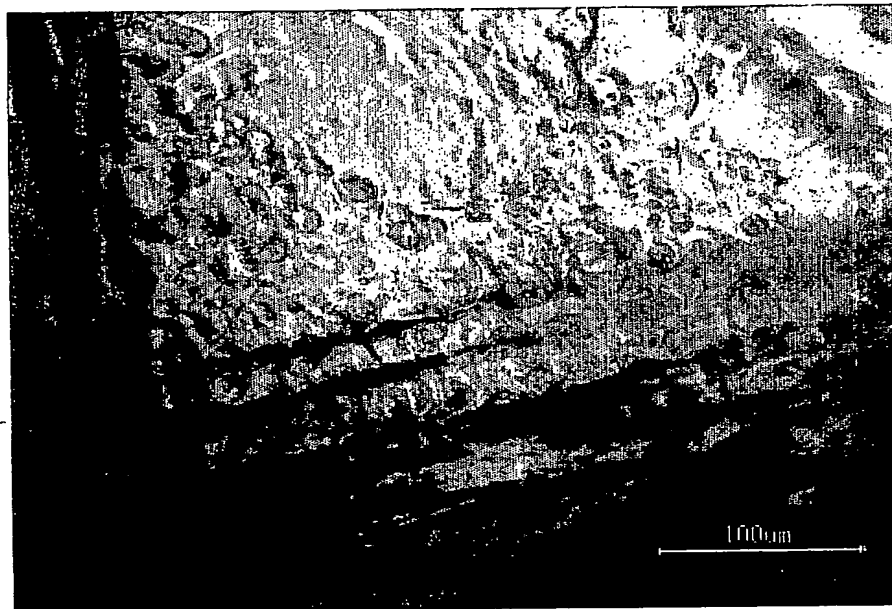
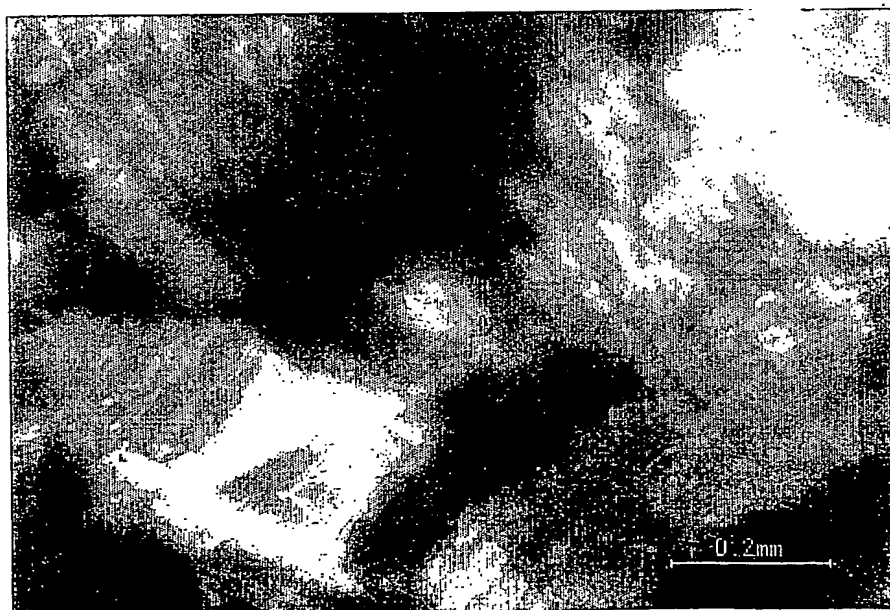
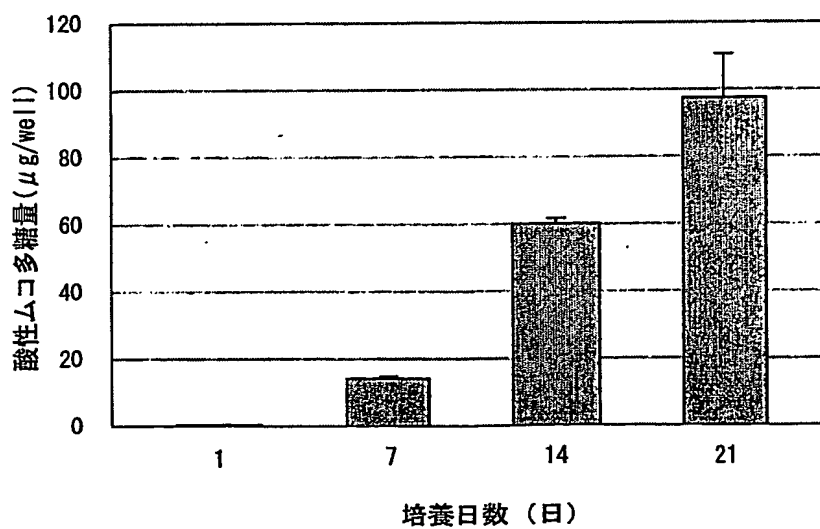
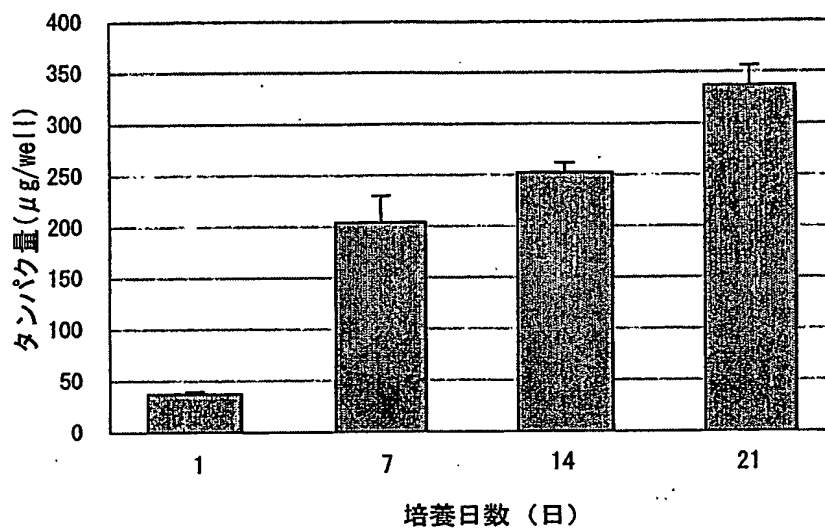


図 2



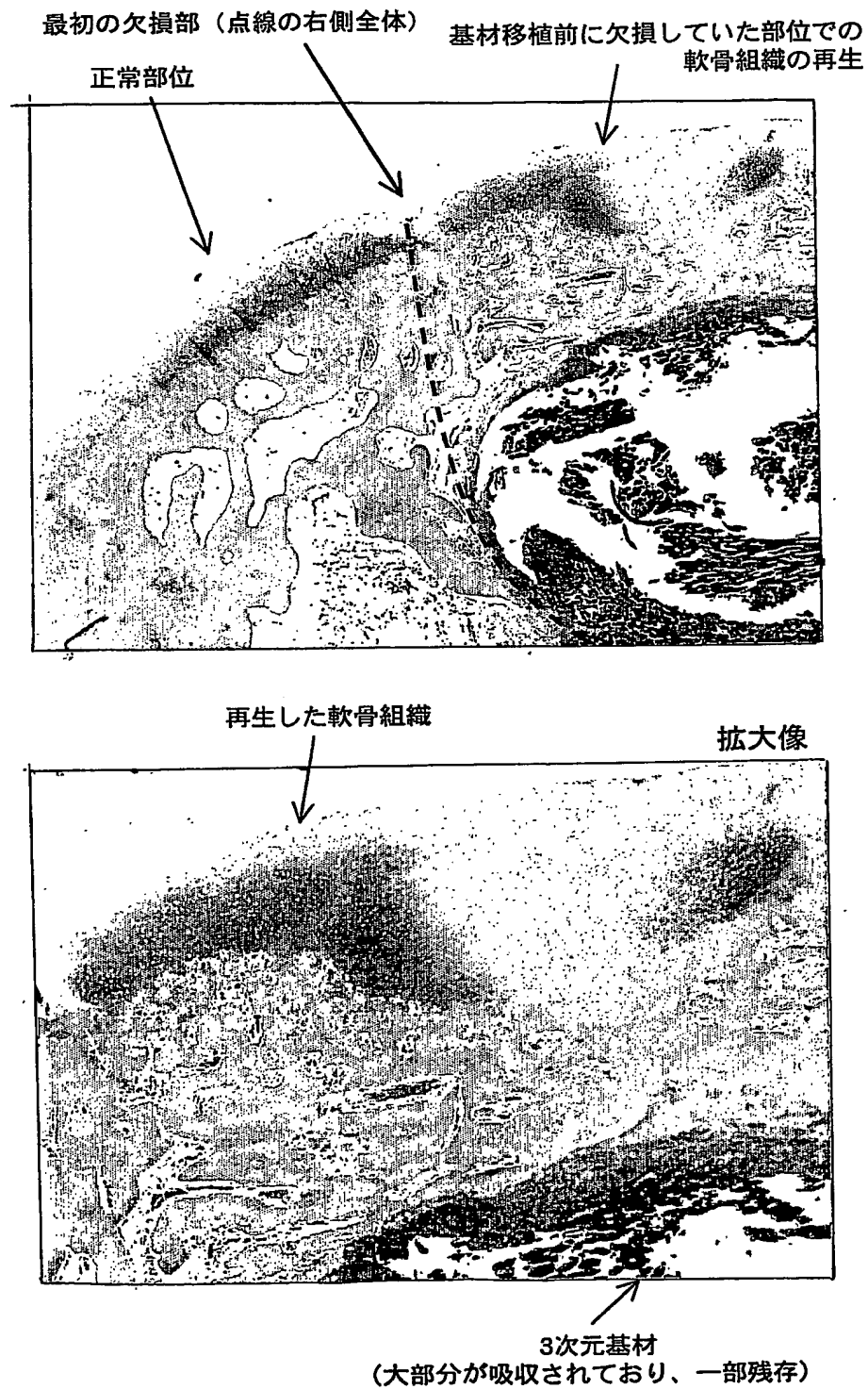
2/5

図 3



3/5

図 4



4/5

図 5

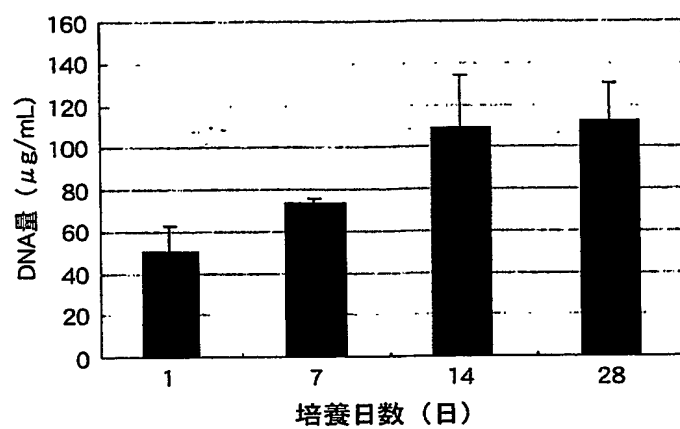
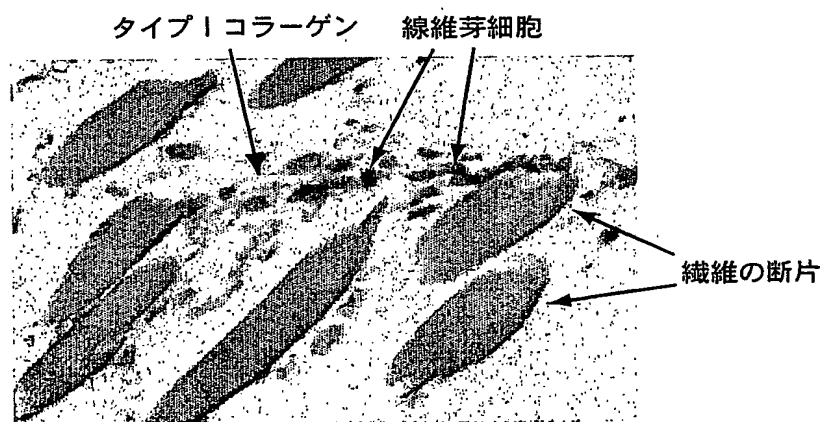


図 6



5/5

図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M1/00, C12N11/02, 5/06, A61L27/00, D01F8/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12M1/00, C12N11/02, 5/06, A61L27/00, D01F8/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JICST)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Shintaro YAMANE et al., "Chitosan-Hyaluronic-san Hybrid Sen'i o Mochiita Sanjigen Nankotsu Saibo Baiyo, Saibogai Matrix Sanseino no Hyoka", Ishoku, 10 April, 2003 (10.04.03), 38(2), p.158, 19	1-15
A	JP 3-15475 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 23 January, 1991 (23.01.91), Full text (Family: none)	1-15
A	JP 6-277038 A (Iatron Laboratories, Inc.), 04 October, 1994 (04.10.94), Full text (Family: none)	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2003 (02.09.03)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08080

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-128958 A (Shin'ichiro NISHIMURA), 09 May, 2002 (09.05.02), Full text (Family: none)	1-15
A	EP 544259 A1 (LIGNYTE CO., LTD.), 02 June, 1993 (02.06.93), Full text & JP 6-73103 A	1-15
A	JP 9-173362 A (Menicon Co., Ltd.), 08 July, 1997 (08.07.97), Full text (Family: none)	1-15
A	JP 2002-146086 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 22 May, 2002 (22.05.02), Full text (Family: none)	1-15
A	EP 1201749 A1 (MERCK PATENT GMBH), 02 May, 2002 (02.05.02), Full text & US 2002/0052044 A1 & JP 2002-78484 A	11
A	WO 01/64848 A1 (Takagi Industrial Co., Ltd.), 07 September, 2001 (07.09.01), Full text & EP 1266960 A1 & US 2001/0021529 A1 & US 2002/0037586 A1 & US 2002/0098586 A1 & US 6432713 B1 & US 6599734 B2 & JP 2001-238663 A	11
A	WO 95/01810 A1 (SMITH & NEPHEW PLC), 19 January, 1995 (19.01.95), Full text & EP 707498 A1 & JP 9-500298 A	14
E,A	JP 2002-291461 A (Shin'ichiro NISHIMURA et al.), 08 October, 2002 (08.10.02), Full text (Family: none)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12M1/00, C12N11/02, 5/06, A61L27/00, D01F8/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12M1/00, C12N11/02, 5/06, A61L27/00, D01F8/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS/WPI (DIALOG)
JSTPlus (JICST)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	山根慎太郎, 他7名, キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を用いた三次元軟骨細胞培養, 細胞外マトリックス産生能の評価, 移植, 2003. 04. 10, 38(2), p. 158, 19	1-15
A	JP 3-15475 A(積水化学工業株式会社) 1991. 01. 23 全文(ファミリーなし)	1-15
A	JP 6-277038 A(株式会社ヤトロン) 1994. 10. 04 全文(ファミリーなし)	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 03

国際調査報告の発送日 16.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-128958 A(西村紳一郎)2002. 05. 09 全文(ファミリーなし)	1-15
A	EP 544259 A1(LIGNYTE CO., Ltd.)1993. 06. 02 全文 & JP 6-73103 A	1-15
A	JP 9-173362 A(株式会社メニコン)1997. 07. 08 全文(ファミリーなし)	1-15
A	JP 2002-146086 A(独立行政法人産業技術総合研究所)2002. 05. 22 全文(ファミリーなし)	1-15
A	EP 1201749 A1(MERCK PATENT GMBH)2002. 05. 02 全文 & US 2002/0052044 A1 & JP 2002-78484 A	11
A	WO 01/64848 A1(高木産業株式会社)2001. 09. 07 全文 & EP 1266960 A1 & US 2001/0021529 A1 & US 2002/0037586 A1 & US 2002/0098586 A1 & US 6432713 B1 & US 6599734 B2 & JP 2001-238663 A	11
A	WO 95/01810 A1(SMITH & NEPHEW PLC)1995. 01. 19 全文 & EP 707498 A1 & JP 9-500298 A	14
EA	JP 2002-291461 A(西村紳一郎, 他 2 名)2002. 10. 08 全文(ファミリーなし)	1-15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.